



Código: PICYDT-CAyT-06-2022

“PRODUCCIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES QUE PERMITAN EL DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO ESPECÍFICO DE FLAVIVIRUS DE IMPORTANCIA REGIONAL”

Directora: PERALTA, Andrea

Co Directora: GARANZINI, Débora

Integrantes: SOARES CAMPOS, Gubio; CURRA, Anabela;
RAIBENBERG, Fernando; PRIETO, Luciano; RAMIREZ, Luciana

Año: 2024



Informe Final de Proyectos de Investigación Universidad Nacional de Moreno

Identificación del proyecto

Tipo de proyecto y año de convocatoria:	PICyDT UNM VII 2021
Nombre completo del proyecto:	PRODUCCIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES QUE PERMITAN EL DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO ESPECÍFICO DE FLAVIVIRUS DE IMPORTANCIA REGIONAL
Director/a:	Dra. Andrea Peralta
Lineamiento prioritario ¹	Biología Molecular y Celular
Fecha de inicio:	01/08/2022
Fecha de finalización:	31/07/2024
Unidad de localización: Departamento/centro/ Programa	Departamento de Ciencias Aplicadas y Tecnología Programa para la Investigación e Innovación en Biotecnología
Resumen: <i>a(máx. 300 palabras)</i>	Los Flavivirus como Dengue, Zika, Fiebre Amarilla, Encefalitis de San Luis, impactan en los sistemas de salud debido a la incidencia de los casos y al desarrollo de síntomas discapacitantes. En los primeros días pueden causar cuadros clínicos similares (fiebre alta, dolor articular, enrojecimiento, etc), lo que conduce a la necesidad de diagnosticar eficientemente a cada uno, dados las complicaciones que algunos de estos virus conllevan. Si bien los métodos de diagnóstico molecular (RT-PCR) son específicos y sensibles, son costosos y no todos los centros médicos tienen capacidad para realizarlos, además, la ventana en la que se los puede utilizar es muy acotada. Por tal razón, la mayor parte del diagnóstico se realiza mediante serología, que no requiere de gran equipamiento. Sin embargo, es necesario tener en cuenta que los flavivirus generan reacción cruzada de anticuerpos contra las proteínas estructurales. En este contexto, la proteína no estructural NS1 resulta clave para el diagnóstico diferencial de los flavivirus. En este proyecto, proponemos expresar las proteínas NS1 de dos flavivirus: Dengue y Zika, evaluar las condiciones de purificación, su escalado, y la transferencia para su evaluación en ensayos serológicos de producción nacional. Esta tecnología puede ser ampliada en el futuro a proteínas NS1 de otros flavivirus.
Palabras claves:	Proteína NS1, Dengue, Flavivirus, Diagnóstico serológico

¹ Según Resolución CS 326/17 Líneas de investigación científica y desarrollo tecnológico prioritarias 2016-21/ó Res. R 449/18 Lineamientos estratégicos generales de Investigación y transferencia 2019/21 del CEDET

Parte I

Informe de resultados para el repositorio²

1. Introducción y objetivos (*mínimo 1 página- máximo 2 páginas*)

- Realizar una presentación general del estudio (tema/problema) y una justificación de su relevancia (motivos para estudiarlo, aportes potenciales).
- Indicar el objetivo general de la investigación y los interrogantes efectivamente trabajados en el proyecto.

Las epidemias causadas por arbovirus (virus transmitidos por vectores artrópodos) se presentan como un serio problema para la salud pública en regiones tropicales y subtropicales. En la Argentina la arbovirosis de mayor importancia es la provocada por el virus Dengue (DENV), detectándose la circulación de los cuatro serotipos virales en diferentes provincias y años. Otras Arbovirosis como la Fiebre Amarilla (YFV reemergente), el Zika (ZIKV) y la fiebre Chikungunya (CHIKV) de aparición reciente en el continente impactan en los sistemas de salud debido a la incidencia de los casos y al desarrollo de síntomas discapacitantes. La transmisión de estas enfermedades se produce principalmente a través de la picadura del mosquito *Aedes aegypti* infectado, que se cría en recipientes y objetos que acumulan agua en regiones urbanas y periurbanas. Los virus ZIKV y DENV son transmitidos por mosquitos del género *Aedes* (Epelboin et al., 2017) y como comparten vector, las áreas donde se detectan casos de Dengue y Zika se solapan. Ambos virus causan grandes epidemias en el Caribe y Centro y Sur América, sin embargo, a causa del turismo y los viajes en avión que acortan distancias, es posible que personas con residencia temporal en regiones endémicas, al regresar su lugar de origen se encuentren infectadas y con viremia. Si bien estos casos son detectados y catalogados como “importados”, pueden ser fuente de contagios autóctonos si el mosquito vector se encuentra en ese país.

En el hombre, ZIKV y DENV causan cuadros clínicos similares (Bachiller-Luque et al., 2016; Braga et al., 2017). El diagnóstico de estos virus se puede realizar de diversas maneras, según el momento en el que el paciente acude al centro médico (Algoritmo del SNVS).

Si bien los métodos de diagnóstico molecular (RT-PCR) son específicos y sensibles como para permitir el diagnóstico en los primeros días de infección, son costosos y no todos los centros médicos tienen capacidad para realizarlos, además, la ventana en la que se los puede utilizar es muy acotada. Por tal razón, la mayor parte del diagnóstico se realiza mediante serología, que no requiere de gran equipamiento. Sin embargo, es necesario tener en cuenta que los flavivirus generan reacción cruzada de anticuerpos contra las proteínas estructurales (Priyamvada et al., 2017). Esto es especialmente problemático en las regiones endémicas donde los flavivirus co circulan.

En nuestro país, el diagnóstico serológico de ZIKV y DENV se realiza en el Centro Nacional de Referencia “Instituto Maiztegui” y consiste en un ensayo de seroneutralización por reducción

² Se solicita brindar información detallada en los campos que componen esta Parte I, ya que será publicada en el Repositorio online de la UNM. Esto permitirá difundir de manera amplia la investigación, sus resultados y visibilizar la labor de los miembros del equipo de investigación.

de placas (PRNT). Esta técnica es compleja ya que deben emplearse controles con otros flavivirus (DENV, ZIKV, YFV y dependiendo de la provincia del cual es originario el paciente, es necesario agregar virus West Nile o el virus de la Encefalitis de Saint-Luis). Es una técnica compleja que requiere infraestructura y personal altamente capacitado.

Resulta evidente, que se necesita contar con un antígeno que posibilite el diagnóstico serológico diferencial de los flavivirus de interés, mediante una técnica sencilla como el ELISA.

Por este motivo, diversos grupos han puesto el interés en la proteína no estructural NS1. Se observó que a tiempos muy tempranos de infección se generan anticuerpos contra esta proteína y que al utilizarse como antígeno en ensayos de ELISA permite la detección cero específica de flavivirus.

Objetivo General: Obtener en un sistema de expresión eucariota, una forma recombinante de la proteína NS1 del virus Dengue y del virus Zika, fusionadas un tag de Histidinas que permita su purificación mediante IMAC.

Objetivos particulares:

- Amplificar la secuencia codificante para la proteína NS1 de DENV a partir de genoma viral.
- Clonar la secuencia codificante de NS1 en un plásmido de expresión constitutiva en células de mamífero, que además aporte un tag de 6X-His a la proteína recombinante.
- Transfectar cultivos de células HEK-293 con los plásmidos recombinantes pSecTag-NS1-Zikv y pSecTagNS1-Denv.
- Evaluar la expresión de las proteínas recombinantes mediante ensayos de Western blot, utilizando para ello un anticuerpo monoclonal anti-His.
- Establecer las condiciones óptimas de purificación de las proteínas recombinantes mediante IMAC.
- Escalar la producción.

2. Marco de referencia (min. 2 páginas- máx. 5 páginas)

Describir en qué campo (temático, disciplinar) se inserta la investigación, indicando:

- estudios antecedentes (propios o no) sobre el tema, avances y áreas de discusión.
- marco teórico o encuadre de referencia de la investigación: con qué enfoque, conceptos, dimensiones o modelos se abordó el tema/problema.

El genoma de los Flavivirus codifica para tres proteínas estructurales (C, prM, E) y siete proteínas no estructurales (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B y NS5). En el ambiente de infección viral, a partir del genoma viral de ARN se sintetiza una poliproteína que mediante sucesivos y específicos clivajes da lugar a las distintas proteínas del virus.

En el hombre, ZIKV, DENV, CHIKV, pueden causar cuadros clínicos similares (fiebre alta, dolor articular, enrojecimiento, etc), lo que conduce a la necesidad de diagnosticar eficientemente a cada uno, dados las complicaciones que algunos de estos virus conllevan (Dengue Hemorrágico en el caso de DENV, efectos teratógenicos y asociación al síndrome Guillain-Barré para ZIKV).

El diagnóstico de estos virus se puede realizar de diversas maneras, según el momento en el que el paciente acude al centro médico. Si bien los métodos de diagnóstico molecular (RT-PCR) son específicos y sensibles, son costosos y no todos los centros médicos tienen capacidad para realizarlos, además, la ventana en la que se los puede utilizar es muy acotada (únicamente en

la fase aguda de la enfermedad, entre 1 y 3 días de comenzados los síntomas). Por tal razón, la mayor parte del diagnóstico se realiza mediante serología, que no requiere de gran equipamiento. Sin embargo, es necesario tener en cuenta que los flavivirus generan reacción cruzada de anticuerpos contra las proteínas estructurales, especialmente contra la proteína E de superficie del virus.

Ante el desafío de un diagnóstico serológico diferencial para los flavivirus, numerosos grupos de investigación evaluaron distintas proteínas. En este contexto comenzó a ganar relevancia la proteína NS1 primero estudiada en el virus del Dengue y luego se extendió su estudio al resto de los flavivirus. La proteína no estructural NS1 se presenta en dos formas: una forma citoplasmática y otra forma que es secretada de la célula infectada. La forma citoplasmática está asociada a las vesículas membranosas donde ocurre la replicación viral, mientras que la forma extracelular es secretada y glicosilada por la vía retículo endoplásmico-Golgi. No está del todo claro cómo es que una proporción de NS1 cumple su función en citoplasma mientras que otra proporción de proteína NS1 es traslocada al retículo, glicosilada y secretada de la célula infectada.

La forma secretada de NS1, que la célula infectada libera al torrente sanguíneo, estimula al sistema inmune a producir una respuesta humoral contra ella (Muller & Young, 2013; Rastogi et al., 2016). Se observó (tanto en modelos animales de infección como en humanos) la circulación de anticuerpos contra NS1 de DENV durante la fase aguda de la enfermedad (Young et al., 2000; Alcon et al., 2000). Más tarde esto fue corroborado para otros flavivirus (Macdonald et al., 2005; Chung y Diamond 2008).

Diferentes tests para el diagnóstico serológico de DENV fueron desarrollados en base a la proteína NS1 (Chaiyaratana et al., 2009; Zainah et al., 2009), que fueron validados en numerosos ensayos comparativos con otros métodos diagnósticos. El éxito obtenido trasladó la metodología a distintos integrantes de la familia flavivirus (ZIKV, YFV y CHIKV) hasta desarrollarse en Europa test comerciales basados en NS1 para el diagnóstico serológico específico. Para no depender de la importación de kits comerciales, es necesario contar con producción nacional de antígeno NS1 que permita realizar el diagnóstico.

Dado que la proteína inmunogénica es la forma secretada y glicosilada, nos propusimos expresar y purificar la proteína NS1 de ZIKV y DENV en cultivos de células de mamífero, para garantizar su correcto procesamiento.

También tuvimos en cuenta que para asegurar que toda la proteína NS1 expresada en un sistema heterólogo pase por la vía de secreción y glicosilación, es necesario incorporar en la secuencia codificante, una secuencia que sea reconocida como señal de secreción. Esta señal de secreción fue aportada por el vector de expresión en el que se clonó la secuencia codificante de NS1.

Por otro lado, en la bibliografía referente a los tests de ELISAs disponibles en Europa, la proteína NS1 recombinante utilizada está fusionada en su extremo carboxilo con un tag de seis Histidinas (Liu et al., 2017). El tag 6xHis es utilizado para marcar y purificar proteínas recombinantes expresadas en distintos sistemas (bacterias, células de insecto, células de mamífero) desde hace décadas. Por todo esto, el vector de expresión que se usó para expresar la proteína NS1 recombinante fue pSecTag2, ya que posee bajo el promotor de citomegalovirus (PCMV) un codón ATG de inicio, la secuencia señal de secreción, un sitio múltiple de clonado (donde se inserta la secuencia de interés), a continuación, la secuencia para el tag 6xHis y finalmente un codón STOP.

Finalmente, seleccionamos a la línea celular HEK293T por su alta eficiencia de transfección y facilidad para su crecimiento in vitro.

Los integrantes de este proyecto tienen experiencia tanto en biología molecular como en cultivos celulares. Participamos en proyectos de investigación de la universidad relacionados con este tema desde 2019, con el PI-CAyT-05- 2019 “Desarrollo de una Unidad de Epidemiología Molecular de Arbovirus (UEMA)”. Además, se realizó un trabajo final de licenciatura (TFI) que implicó la amplificación y clonado de la secuencia de NS1 de ZIKV (trabajo presentado en 2021). Por otro lado, contamos con la invaluable colaboración y asesoramiento del Dr. Gubio Soares Silva (Universidad Federal de Bahía, Brasil).

3. Métodos y técnicas (min. 2 páginas- máx. 4 páginas)

Indicar el trabajo de campo, documental y/o de laboratorio realizado, la forma de recolección de datos y sus fuentes. Al respecto, describir los métodos, técnicas, instrumentos y materiales utilizados para indagar el problema de investigación. Explicitar las unidades de análisis, los criterios de selección de muestras o casos. Indicar asimismo las formas de procesamiento y análisis de los datos recolectados.

-Diseño de oligonucleótidos:

Para amplificar la secuencia codificante para NS1 de DENV, se tuvo en cuenta que esta secuencia debe quedar en el marco de lectura correcto entre las secuencias de direccionamiento a retículo y el tag 6X-His aportadas por el vector de expresión eucariota pSecTag2.

Para el diseño de los oligos For y Rev, se obtuvieron secuencias de DENV de los cuatro serotipos disponibles en el Gen Bank (sólo secuencias provenientes de Brasil, ver el siguiente punto) y se realizó un alineamiento con el programa BioEdit (v7.2.5). Se analizó el grado de conservación de las regiones lindantes a la secuencia de NS1. Como no fue posible diseñar un par de oligonucleótidos que sirviera para los cuatro serotipos, se diseñaron oligonucleótidos For y Rev para cada uno de ellos.

-Amplificación de la secuencia codificante para NS1:

A partir de genoma viral de DENV (cedido por el Dr. Gubio Soares Campos, Brasil), se realizó una reacción de transcripción reversa con randoms hexamers, dNTPs, y la enzima M-MLV (Promega) siguiendo las instrucciones del protocolo estándar. Una vez obtenido el cDNA, se realizó una reacción de PCR con los oligos diseñados para este trabajo y el sistema GoTaq (Promega).

En primer lugar, se realizó una PCR control de dengue (universal a los cuatro serotipos) y luego la PCR específica para la amplificación de NS1. Sólo obtuvimos amplificación en los casos de DENV-1 y DENV-4.

Los amplicones fueron clonados en el vector pGEMT-easy (Promega) y enviados a Secuenciación para la correcta identificación y verificación de la secuencia amplificada.

-Subclonado en el vector de expresión:

La construcción pGEMT-NS1D1 y pGEMT-NS1D4 fueron digerida con las enzimas de restricción apropiadas, al igual que el vector pSecTag2, al que además se le removieron los extremos fosfatos mediante la acción de la enzima CIP (Calf Intestinal Phosphatase Alkaline, NEB). Una vez purificados el inserto NS1 y el vector pSecTag2 linealizado, se realizó una reacción de ligado molecular, en una relación inserto:vector 3:1. Con la ligación obtenida se transformaron

bacterias DH5-alfa y se analizaron las colonias obtenidas mediante análisis de minipreparaciones (minipreps) de ADN plasmídico y digestión con enzimas de restricción.

-Obtención de ADN de calidad para transfección:

Cultivos de bacterias (10ml) conteniendo los clones pSecTag-NS1D1, pSecTag-NS1D4 (obtenidos en el punto anterior) o pSecTag-NS1Z (ya disponible en nuestro grupo), fueron procesados mediante el kit comercial “Puriprep-P kit” (Inbio Highway), con el fin de obtener suficiente ADN de calidad para transfección.

-Transfección de células de mamífero:

Cultivos de células HEK293T crecidas en placas de 12 pocillos, fueron transfectadas con 100ng, 200ng o 300ng del vector pSecTag-NS1D1, pSecTag-NS1D4 y pSecTag-NS1Z y con el agente lipofectante PolyAr87 (FFyB, UBA). Como control de transfección se utilizó el vector pCDNA-GFP que expresa la proteína GFP fusionada a un tag 6xHis y bajo el control del PCMV.

A las 48hs post-transfección, se cosecharon las células y los sobrenadantes de cultivo. Los sobrenadantes fueron concentrados mediante precipitación con TCA (ácido tri-cloro-acético). Tanto las células como los sobrenadantes concentrados fueron analizados mediante ensayos de Western blot para determinar la expresión de la proteína NS1 recombinante. Para este fin se utilizó un anticuerpo monoclonal comercial anti-Histidinas (Invitrogen) y un segundo anticuerpo anti-ratón conjugado a la enzima fosfatasa alcalina. Finalmente se agregó el reactivo colorimétrico NBT-BCIP.

-Ensayo de solubilidad:

Para determinar en qué condiciones se puede extraer la proteína NS1, las células transfectadas con las construcciones pSecTag-NS1D1, pSecTag-NS1D4 y pSecTag-NS1Z (y crecidas en placas de 6 pocillos) fueron cosechadas a las 72 horas post transfección. Las células se lavaron con PBS y divididas en dos tubos: en uno se las resuspendió con buffer nativo (NaH_2PO_4 pH8 25mM; NaCl 250mM) y en el otro se utilizó buffer desnaturalizante (Urea 8M; fosfato de sodio pH6 20mM; NaCl 500mM). Luego de dos ciclos de congelado y descongelado (para asegurar la lisis celular), se centrifugó y se separó la fracción soluble (SN) del pellet (P). Las muestras se analizaron mediante ensayo de western blot.

Posteriormente, se optimizó el protocolo de lisis al agregar un paso de sonicación (3 ciclos de 10 pulsos a intensidad media con descanso de 1 minuto entre ciclos) luego de los pasos de congelado y descongelado.

-Interacción con la resina Ni-NTA:

El extracto proteico obtenido en condiciones nativas (protocolo optimizado) se incubó con la resina Ni-NTA (QIAGEN) durante 1h a temperatura ambiente. Todo el proceso de purificación por IMAC se realizó “in batch” lo que simplifica el proceso ya que se puede realizar empleando tubos de tipo Falcon y centrífugas de mesa. Se evaluaron las condiciones de lavado (buffer nativo + 20mM imidazol o buffer nativo + 75 mM imidazol) y elución (volumen y cantidad de eluidos). Todas las fracciones fueron analizadas mediante western blot.

-Subclonado de las proteínas marcadoras de organelas:

A partir de los plásmidos de expresión de células de insecto pIB-cherryER y pIB-GolgiCh (que expresan proteínas marcadoras de retículo y Golgi, respectivamente, fusionadas a la proteína roja fluorescente) se amplificó la región codificante de estas quimeras mediante el uso de los primers T7 y BGHrev. Una vez obtenidos los amplicones (780pb para cherryEr y 2240pb para GolgiCh) estos fueron clonados en el vector Topo para su secuenciación direccional con los

primers M13F y M13R. Debido al tamaño de la quimera GolgiCh, no pudo ser corroborada su secuencia por completo.

Los clones seleccionados fueron digeridos mediante la enzima de restricción EcoRi y clonados en el vector de expresión en células de mamífero pCDNA. Luego del análisis de minipreps de las colonias resultantes, se seleccionaron clones para obtener ADN de calidad que permitió realizar el ensayo de transfección en células HEK293T.

4. Resultados y discusión (min. 5 páginas- máx. 15 páginas)

Desarrollar los resultados, en relación a los objetivos del proyecto, especificando (de ser posible) los siguientes aspectos:

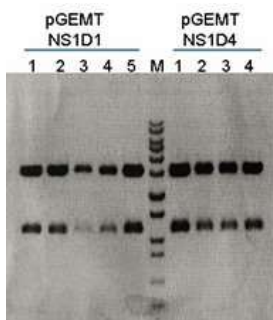
- nuevos conocimientos obtenidos sobre los casos o unidades bajo estudio.
- avances en materia de conocimiento científico sobre el tema bajo estudio, formulación de enfoques originales e innovadores (modelos, conceptos, etc.).
- Contribuciones para la resolución de problemas específicos y/o formulación de herramientas de intervención, diseño o mejora de productos y procesos.

Por último, desarrollar las conclusiones y reflexiones finales a las que se llegó luego de la investigación, en relación a los interrogantes y objetivos planteados.

Amplificación de la secuencia codificante para NS1:

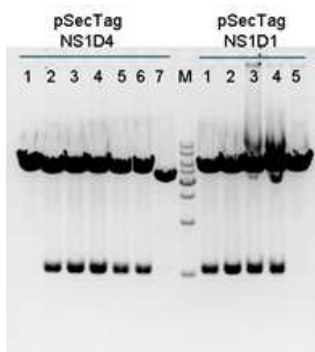
Con el cDNA obtenido en el laboratorio del Dr. Gubio Soares Campos (Brasil), se realizó una reacción de PCR control de dengue (universal a los cuatro serotipos) y en todas las muestras se observó la amplificación de 360pb indicando que hay cDNA de dengue. Luego, se realizó la PCR específica para la amplificación de NS1 en los cuatro serotipos. Sólo obtuvimos amplificación en los casos de DENV-1 y DENV-4. La falta de amplificación en las muestras de DENV-2 y DENV-3 probablemente se deba a una diferencia entre la secuencia blanco y la secuencia de alguno de los oligonucleótidos diseñados.

Los amplicones fueron clonados en el vector pGEMT-easy (Promega) y enviados a Secuenciación para la correcta identificación y verificación de la secuencia amplificada



-Subclonado en el vector de expresión:

La construcción pGEMT-NS1D1 y pGEMT-NS1D4 fueron digerida con las enzimas de restricción apropiadas, al igual que el vector pSecTag2. Una vez purificados los fragmentos digeridos, se realizó la ligación y transformación de bacterias DH5 alfa. Los clones resultantes se analizaron mediante minipreps y digestión con enzimas de restricción.

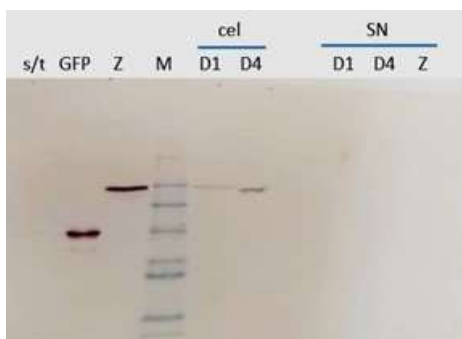


-Obtención de ADN de calidad para transfección:

Una vez identificados los clones pSecTag-NS1D1, pSecTag-NS1D4 (obtenidos en el punto anterior) o pSecTag-NS1Z (ya disponible en nuestro grupo), fueron procesados mediante el kit comercial “Puriprep-P kit” (Inbio Highway), con el fin de obtener suficiente ADN de calidad para transfección.

-Transfección de células de mamífero:

Cultivos de células HEK239T crecidas en placas de 12 pocillos, fueron transfectadas con 100ng, 200ng o 300ng del vector pSecTag-NS1D1, pSecTag-NS1D4 y pSecTag-NS1Z y con el agente lipofectante PolyAr87 (FFyB, UBA). Como control de transfección se utilizó el vector pCDNA-GFP-6xHis. Se realizaron cosechas de células y sobrenadante (SN) a las 24, 48 y 72h post transfección. El SN se concentró mediante precipitación con TCA 10%. Los extractos celulares y el SN concentrado fueron analizados mediante ensayo de western blot.



Como se puede apreciar, si bien las proteínas NS1 de ZIKV, DEN-1 y DENV-4 se expresan, sólo se detectan en la fracción celular. Para descartar que se trata de un problema de sensibilidad del sistema de revelado, repetimos el ensayo de western blot pero revelando con el sistema ultrasensible de quimioluminiscencia y ni aún así fue posible detectar la proteína en el SN. Además, el menor nivel de expresión de NS1-D1 respecto a las otras NS1 se repitió en todos los ensayos que realizamos.

Análisis in sílico:

El resultado inesperado, nos indujo a secuenciar las tres construcciones en pSecTag, y corroboramos que la secuencia señal de exportación que aporta el vector y la secuencia de NS1 están correctas y en marco de lectura, por lo que se descarta un problema de este tipo.

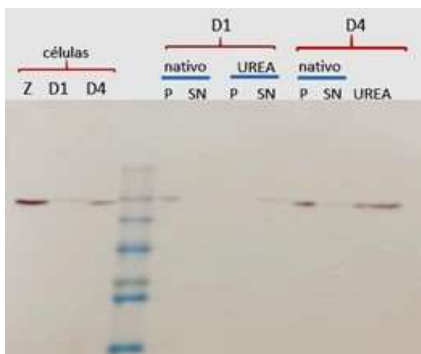
El análisis de las proteínas recombinantes expresadas por pSecTag, mediante distintos algoritmos de predicción (<https://services.healthtech.dtu.dk/>) corroboró una vez más, que

esas proteínas deberían ser exportadas al medio extracelular. Por lo que debe existir algún factor biológico, no caracterizado hasta el momento, que impide esta secreción.

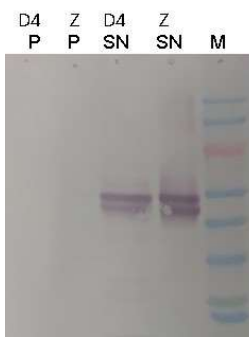
-Ensayo de solubilidad:

Con el fin de evaluar si las proteínas NS1 que quedan retenidas en la célula, igual pueden ser usadas como antígeno recombinante, nos propusimos evaluar en qué condiciones pueden ser extraídas.

En primer lugar, ensayamos la extracción en condiciones nativas y en condiciones desnaturizantes.



Como se puede apreciar, sólo fue posible extraer NS1 usando condiciones desnaturizantes. Esto no sería compatible con el uso de esta proteína con fines diagnósticos. Por lo tanto, evaluamos agregar un paso extra de tratamiento de sonificado bajo condiciones nativas.



Agregando el paso de sonificado, fue posible extraer casi por completo a la proteína NS1 en condiciones nativas. Si bien es posible observar una banda muy tenue en el pellet, es casi despreciable.

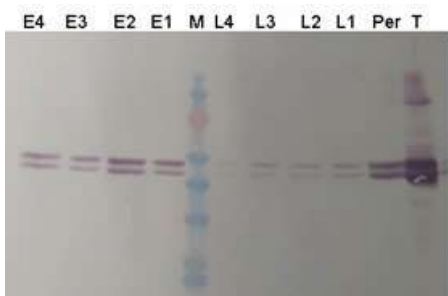
Por lo tanto, continuamos trabajando en estas condiciones de extracción.

Ensayo de purificación en resina de Níquel:

Una vez que corroboramos que es posible extraer del interior de la célula transfectada a la proteína recombinante NS1, se realizó un ensayo de purificación mediante IMAC (resina de níquel Ni-NTA). Para esto, se transfectaron con la construcción pSecTagNS1D4, células HEK293T crecidas en tres pocillos de una placa de 6w. A las 72h post transfección se cosecharon las células y se las procesó con el protocolo optimizado en el punto anterior.

Con el extracto soluble se realizó una incubación de 1h con la resina Ni-NTA equilibrada. Se decidió trabajar “in batch”, por lo tanto luego de la interacción extracto proteico con la resina, se centrifugó y se tomó el sobrenadante, que consiste en el Percolado (todo aquello que no se unió a la resina). Luego, se realizaron cuatro lavados con solución de lavado (buffer nativo + 20mM imidazol) y se tomaron muestras de cada uno. Finalmente, se realizaron 4 eluciones con buffer nativo + 250mM de imidazol y se tomaron muestras.

Todas las muestras fueron analizadas mediante ensayo de western blot para determinar en qué fracción se encuentra la proteína recombinante.



Como se puede observar, la proteína NS1D4 pudo ser eluída de la resina (fracciones E1 a E4). Aunque es considerable la fracción que se encuentra en el percolado. Esto nos indica que en este ensayo usamos poca resina y el sistema se saturó.

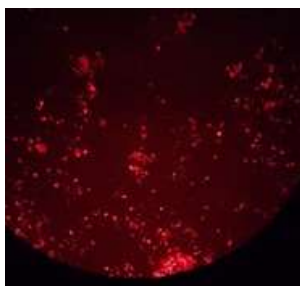
Pero de este ensayo rescatamos que la proteína recombinante puede ser purificada mediante IMAC.

Construcción para determinar retención celular:

Con el fin académico de determinar la ubicación subcelular en la que queda retenida la proteína recombinante, se pensó realizar un ensayo de colocalización, utilizando proteínas marcadoras de retículo o de Golgi fusionadas a la proteína cherry (brilla en rojo) y la inmunomarcación de NS1 mediante el anticuerpo monoclonal anti-myc y luego un anti-ratón conjugado con Alexxa (brilla en color verde).

Para esto, contábamos con dos construcciones pIB-cherryER y pIB-GolgiCh, que expresan las proteínas marcadoras de retículo (ER) o Golgi fusionada a la proteína cherry. Pero estas construcciones con plásmidos de expresión en células de insecto, por lo que tuvimos que realizar varios pasos de subclonado para trasladar las distintas construcciones al vector pCDNA (de expresión en células de mamífero).

Una vez obtenidas las construcciones pCDNA-cherryER y pCDNA-GolgiCh, realizamos una transfección para corroborar la funcionalidad de estas construcciones.



En la foto se observa la expresión de cherry en células HEK293T transfectadas con la construcción pCDNA-cherryER. Lamentablemente no obtuvimos ningún clon que expresara en la construcción marcadora de Golgi.

Por este motivo, no pudimos realizar el ensayo de colocación subcelular y poder determinar en qué organela queda retenida la proteína NS1.

5. Nuevos interrogantes y líneas de investigación a futuro

Consignar si la investigación hizo surgir nuevos interrogantes o si emergieron potenciales líneas de investigación a desarrollarse en el futuro a partir de los hallazgos.

En este proyecto PICyDT-2021, si bien trabajamos con una secuencia quimérica idéntica a la utilizada por Liu et al., 2017; la diferencia consistió en que el grupo de Liu utilizó un sistema de expresión lentiviral, mientras que nosotros usamos un sistema de expresión transitoria basada en la transfección de un plásmido. A pesar de utilizar el mismo tipo de células (HEK293T), el grupo de Liu logró obtener NS1 en el sobrenadante de cultivo, mientras que nosotros sólo la detectamos en la fracción celular.

Teniendo en cuenta que en el marco de una infección natural por Flavivirus o de una infección in vitro con un lentivirus recombinante, se detecta la proteína NS1 en el sobrenadante de cultivo, mientras que en el marco de una transfección transitorio la proteína queda retenida en la célula, postulamos que tal vez sea necesario un ambiente de estrés celular (el causado por una infección) para que ocurra la detección de la proteína en el medio exterior.

Dado que nuestro grupo cuenta con experiencia en la construcción de baculovirus recombinantes, presentamos un proyecto a la convocatoria PICyDT-X-2023, para evaluar la expresión de las proteínas NS1 de ZIKV, DENV-1 y DENV-4 en el sistema baculovirus-células de insecto.

Además, este sistema nos permitirá comparar la expresión transitoria mediante transfección de células Sf9 (utilizando para ello el plásmido de expresión pIB) y el sistema viral de expresión (baculovirus recombinante).

Otra herramienta que puede ser de utilidad, es que contamos con las construcciones marcadoras de organelas fusionadas a cherry en el vector pIB. Estas construcciones ya han demostrado ser funcionales (Peralta et al., 2013), por lo que podríamos realizar el ensayo de colocación sin problemas.

Si con este sistema viral de expresión logramos obtener la proteína recombinante NS1 en el medio de cultivo, o en grandes cantidades fácilmente extraíbles y purificables mediante IMAC, debemos tener en cuenta que el sistema baculovirus recombinante permite el escalado a gran escala y con bajo costo de producción al utilizar larvas de *Rachiplusia ni* en vez de cultivos celulares de Sf9.

Los especialistas aseguran que, de continuar sin aplicar medidas de mitigación al cambio climático y la destrucción de los diferentes hábitats, las epidemias aparecerán con mayor frecuencia. Los números de casos de dengue observados en los últimos 10 años, concuerdan con esta afirmación. Por lo que contar con un antígeno de producción nacional que pueda contribuir en el diagnóstico, creemos que sería un gran aporte de la universidad a la sociedad.

6. Bibliografía (min. 2 página- máx. 4 páginas)

Consignar los textos y fuentes utilizados en la redacción de los campos anteriores.

- Alcon, S., Talarmin, A., Debruyne, M., Falconar, A., Deubel, V., Flamand, M., 2002. Enzyme-linked immunosorbent assay specific to Dengue virus type 1 nonstructural protein NS1 reveals circulation of the antigen in the blood during the acute phase of disease in patients experiencing primary or secondary infections. *J. Clin. Microbiol.* 40, 376–381.
- Bachiller-Luque, P.; Dominguez-Gil-González, M.; Alvarez-Manzanares, J.; Vázquez, A.; de Ory, F., Sánchez-Seco Fariñas, M.P. First case of Zika virus infection imported to Spain. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 2016, 34, 243–246.
- Boletín Dengue 506, SE30, MinSal, 2020 (www.msal.gob.ar)
- Boletín de la Sociedad Argentina de Pediatría (SAP), 2019.
- Braga, J.U.; Bressan, C.; Dalvi, A.P.R.; Calvet, G.A.; Dumas, R.P.; Rodrigues, N.; Wakimoto, M.; Nogueira, R.M.R.; Nielsen-Saines, K.; Brito, C.; et al. Accuracy of Zika virus disease case definition during simultaneous Dengue and Chikungunya epidemics. *PLoS ONE* 2017, 12, e0179725.
- CDC: www.cdc.org
- Chaiyaratana, W., Chuansumrit, A., Pongthapisith, V., Tangnaratchakit, K., Lertwongrath, S., Yoksan, S., 2009. Evaluation of dengue nonstructural protein 1 antigen strip for the rapid diagnosis of patients with dengue infection. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 64, 83–84.
- Chung, K.M., Diamond, M.S., 2008. Defining the levels of secreted nonstructural protein NS1 after West Nile virus infection in cell culture and mice. *J. Med. Virol.* 80, 547–556
- Chung, K.M., Diamond, M.S., 2008. Defining the levels of secreted nonstructural protein NS1 after West Nile virus infection in cell culture and mice. *J. Med. Virol.* 80, 547–556.
- Epelboin, Y., Talaga, S., Epelboin, L., & Dusfour, I. (2017). Zika virus: An updated review of competent or naturally infected mosquitoes. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 11(11), 1–22.
<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005933>.
- Flamand M., Megret F., Mathieu M., Lepault J., Rey F.A., Debeul V. 1999. Dengue virus type 1 Nonstructural glycoprotein NS1 is secreted from mammalian cells as a soluble hexamer in a glycosylation-dependent fashion. *Journal of Virology* 73: 6104-6110.
- Lindenbach, B.D., Rice, C.M., 2003. Molecular biology of flaviviruses. *Adv. Virus Res.* 59, 23–61.
- Liu J., Wan P., Li Q., Li X., Li A., Chen H., Li J., Liang W., Zheng H., Gu W., Li H. 2017. Construction and identification of recombinant HEK293T cell lines expressing non-structural protein I of Zika virus. *International Journal of Medical Sciences* 14: 1072-1080.
- Macdonald, J., Tonry, J., Hall, R.A., Williams, B., Palacios, G., Ashok, M.S., Jabado, O., Clark, D., Tesh, R.B., Briese, T., Lipkin, W.I., 2005. NS1 protein secretion during the acute phase of West Nile virus infection. *J. Virol.* 79, 13924–13933
- Muller D.A., Young P.R. 2013. The flavivirus NS1 protein: Molecular and structural biology, immunology, role in pathogenesis and application as a diagnostic biomarker. *Antiviral Research* 98: 192-208.
- MinSal, Enfermedades infecciosas Dengue, Guía para el personal de Salud. 2015.
- Peralta A., Maroniche G., Alfonso V., Molinari P., Taboga O. 2013. “VP1 protein of *Foot-and-mouth disease virus* (FMDV) impairs baculovirus surface display”. *Virus Research*. 175: 87-90.
- Priyamvada, L.; Hudson, W.; Ahmed, R.; Wrammert, J. Humoral cross-reactivity between Zika and dengue viruses: Implications for protection and pathology. *Emerg. Microbes Infect.* 2017, 6, e33.
- Rastogi M, Sharma N, Singh SK. 2016. Flavivirus NS1: a multifaceted enigmatic viral protein. *Virol J* 13:131